



*The* NEW ENGLAND JOURNAL *of* MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

## Preoperative Diagnosis of Benign Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology

Erik K. Alexander, M.D., Giulia C. Kennedy, Ph.D., Zubair W. Baloch, M.D., Ph.D., Edmund S. Cibas, M.D., Darya Chudova, Ph.D., James Diggans, Ph.D., Lyssa Friedman, R.N., M.P.A., Richard T. Kloos, M.D., Virginia A. LiVolsi, M.D., Susan J. Mandel, M.D., M.P.H., Stephen S. Raab, M.D., Juan Rosai, M.D., David L. Steward, M.D., P. Sean Walsh, M.P.H., Jonathan I. Wilde, Ph.D., Martha A. Zeiger, M.D., Richard B. Lanman, M.D., and Bryan R. Haugen, M.D.

N ENGL J MED 367:8 NEJM.ORG AUGUST 23, 2012

Humberto Brito – R3 CCP



## ABSTRACT

### ABSTRACT

#### BACKGROUND

Approximately 15 to 30% of thyroid nodules evaluated by means of fine-needle aspiration are not clearly benign or malignant. Patients with cytologically indeterminate nodules are often referred for diagnostic surgery, though most of these nodules prove to be benign. A novel diagnostic test that measures the expression of 167 genes has shown promise in improving preoperative risk assessment.

#### METHODS

We performed a 19-month, prospective, multicenter validation study involving 49 clinical sites, 3789 patients, and 4812 fine-needle aspirates from thyroid nodules 1 cm or larger that required evaluation. We obtained 577 cytologically indeterminate aspirates, 413 of which had corresponding histopathological specimens from excised lesions. Results of a central, blinded histopathological review served as the reference standard. After inclusion criteria were met, a gene-expression classifier was used to test 265 indeterminate nodules in this analysis, and its performance was assessed.

#### RESULTS

Of the 265 indeterminate nodules, 85 were malignant. The gene-expression classifier correctly identified 78 of the 85 nodules as suspicious (92% sensitivity; 95% confidence interval [CI], 84 to 97), with a specificity of 52% (95% CI, 44 to 59). The negative predictive values for “atypia (or follicular lesion) of undetermined clinical significance,” “follicular neoplasm or lesion suspicious for follicular neoplasm,” or “suspicious cytologic findings” were 95%, 94%, and 85%, respectively. Analysis of 7 aspirates with false negative results revealed that 6 had a paucity of thyroid follicular cells, suggesting insufficient sampling of the nodule.

#### CONCLUSIONS

These data suggest consideration of a more conservative approach for most patients with thyroid nodules that are cytologically indeterminate on fine-needle aspiration and benign according to gene-expression classifier results. (Funded by Veracyte.)

From the Departments of Medicine (E.K.A.) and Pathology (E.S.C.), Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston; Veracyte, South San Francisco, CA (G.C.K., D.C., J.D., L.F., P.S.W., J.I.W., R.B.L.); the Departments of Pathology (Z.W.B., V.A.L.) and Medicine (S.J.M.), Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia; the Department of Medicine, Ohio State University College of Medicine, Columbus (R.T.K.); the Department of Pathology, University of Washington School of Medicine, Seattle (S.S.R.); Centro Diagnostico Italiano, Milan (J.R.); the Department of Surgery, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati (D.L.S.); the Department of Surgery, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore (M.A.Z.); and the Department of Medicine, University of Colorado School of Medicine, Aurora (B.R.H.). Address reprint requests to Dr. Alexander at the Thyroid Unit, Division of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, Brigham and Women's Hospital, 75 Francis St., Rm. PBB-B4, Boston, MA 02115, or at [ekalexander@partners.org](mailto:ekalexander@partners.org); or to Dr. Kennedy at Veracyte, Inc., 7000 Shoreline Ct., Suite 250, South San Francisco, CA 94080, or at [giulia@veracyte.com](mailto:giulia@veracyte.com).

## INTRODUÇÃO

---

- Nódulos tireoideanos são achados comuns e raramente são malignos(5-15%)
- Nódulos  $\geq 1\text{cm}$  geralmente exigem investigação
  - A principal ferramenta é a citologia (PAAF)
  - Citologia tem mostrado que 62-85% dos nódulos são de caráter benigno (Bethesda II) evitando assim a cirurgia diagnóstica
- Contudo 15-30% das citologias encontram resultados que não definem o caráter do nódulo (Beth III, IV e V)

## INTRODUÇÃO

---

- Boa parte dos nódulos Beth III e IV terminam em cirurgia diagnóstica que demonstra o caráter benigno da maioria dessas lesões
  - 2-10% desses pacientes saem com alguma morbidade da cirurgia, além da maioria necessitar Levotiroxina exógena o resto da vida
- Tais dados revelam a necessidade de melhorar o Dx pré-operatório das lesões foliculares à citologia

## INTRODUÇÃO

---

- A análise molecular é uma poderosa arma adjuvante à citologia para definir o caráter de nódulos tireoideanos já que 60-70% das lesões malignas exibem ao menos uma mutação genética conhecida
- A análise pra as mutações nos genes BRAF, RAS, RET, PTC, PAX8 e PPAR $\gamma$ , nas citologias indeterminadas mostraram alteração em 16% dos casos, o que se correlacionou com alta especificidade e VPP para lesões malignas

## INTRODUÇÃO

---

- A positividade para esses marcadores pode alterar a conduta, levando a indicar com mais segurança o tratamento cirúrgico
- Marcadores analisados em amostras de sangue periférico tem baixa sensibilidade e baixo VPNegativo, não conseguindo detectar mais de 33% dos cânceres
  - O que não dá segurança para indicar conduta expectante ou cirurgia

## INTRODUÇÃO

---

- Estudos descrevem o desenvolvimento de classificadores de expressão gênica que fazem melhor distinção entre nódulos benignos e malignos
- Para ter aplicabilidade em indicar conduta expectante o teste necessita ter uma alta sensibilidade e um alto VPNegativo
- Os classificadores gênicos já previamente testados apresentaram baixa sensibilidade e sua utilidade não foi validada em grandes amostragens de pacientes



## INTRODUÇÃO

---

- Recentemente um classificador de expressão gênica foi desenvolvido e mostra-se promissor em identificar nódulos benignos
- Este classificador mostrou sensibilidade maior que 90% e VPN maior que 95% em um estudo piloto



## MÉTODOS

---

- Estudo prospectivo e duplo cego: duração de 19 meses
- Multicêntrico: 49 locais nos EUA
- n= 3.789 pacientes (4.812 PAAFs de nódulos  $\geq$  1cm)
  - 577 citologias indeterminadas
    - 413 foram comparadas ao espécimen histopatológico (peça cirúrgica)
      - 265 foram submetidos ao teste de expressão genética

## MÉTODOS

**Table 1. Baseline Demographic and Clinical Characteristics of the Study Cohort.**

Variable	Total Enrollment	Indeterminate Cytologic Findings	Indeterminate Cytologic Findings and Subsequent Surgery	Final Validation Set
<b>Total no.</b>				
Samples	4812	577	413	265
Nodules	4775	567	403	265
Patients	3789	532	378	249
<b>Age of patients — yr</b>				
Mean	53.2	52.8	51.8*	51.5
Range	18–91	19–85	19–85	22–85
<b>Sex — no. of patients (%)</b>				
Male	696 (18.4)	116 (21.8)	84 (22.2)	55 (22.1)
Female	3093 (81.6)	416 (78.2)	294 (77.8)	194 (77.9)
<b>Risk factors — no. of patients (%)</b>				
Radiation exposure — head, neck, or both	91 (2.4)	14 (2.6)	8 (2.1)	8 (3.2)
Family history of thyroid cancer	174 (4.6)	32 (6)	28 (7.4)*	18 (7.2)
<b>Nodules</b>				
<b>Size on ultrasonography — cm</b>				
Median	1.9	2.2	2.3	2.3
Range	0.6–11	0.75–10.3	0.75–10.3	1–9.1
<b>Size group — no. of nodules (%)</b>				
<1.00 cm	37 (0.8)	4 (0.7)	3 (0.7)	0
1.00–1.99 cm	2503 (52.4)	230 (40.6)	153 (38.0)	102 (38.5)
2.00–2.99 cm	1204 (25.2)	153 (27.0)	111 (27.5)	76 (28.7)
3.00–3.99 cm	621 (13.0)	105 (18.5)	76 (18.9)	45 (17.0)
≥4.00 cm	392 (8.2)	74 (13.1)	60 (14.9)	42 (15.8)
Size not available	18 (0.4)	1 (0.2)	0	0

## MÉTODOS

---

- O analisador de expressão gênica
  - Utiliza a expressão de 167 genes para definir a amostra como benigna ou suspeita de malignidade
    - 25 genes constituem filtros iniciais para outras neoplasias mais raras
    - 142 genes principais são usados para definir o caráter benigno ou suspeito da lesão

## MÉTODOS



Samples being processed for Veracyte's Afirma Gene Expression Classifier at the company's laboratory in South San Francisco. Photo: Veracyte / SF

Read more: <http://www.sfgate.com/business/article/Veracyte-gene-test-may-help-curb-thyroid-surgeries-3662048.php#ixzz2EU0p7vxH>

## RESULTADOS

---

- Dos 265 nódulos com citologia indeterminada submetidos à classificação gênica
  - 85 confirmaram-se malignos ao Hx
  - O classificador genético identificou como suspeito 78 desses nódulos
    - Sensib. 92% [intervalo de confiança (CI)95% 84-97]
    - Especif. 52% [CI 95% 44-59]

## RESULTADOS

**Table 2.** Performance of Gene-Expression Classifier, According to Histopathological Subtype.

Histopathological Subtype	No. of Nodules (%)	Result with Gene-Expression Classifier
		<i>no. benign/no. suspicious</i>
<b>Benign</b>		
Total	180 (100)	
Benign follicular nodule*	71 (39.4)	41/30
Follicular adenoma	64 (35.6)	37/27
Follicular tumor of uncertain malignant potential	11 (6.1)	5/6
Well-differentiated tumor of uncertain malignant potential	9 (5.0)	4/5
Hürthle-cell adenoma	21 (11.7)	4/17
Chronic lymphocytic thyroiditis	2 (1.1)	0/2
Hyalinizing trabecular adenoma	2 (1.1)	2/0
<b>Malignant</b>		
Total	85 (100)	
Papillary thyroid carcinoma†	42 (49.4)	4/38
Papillary thyroid carcinoma, follicular variant	19 (22.4)	2/17
Hürthle-cell carcinoma‡	10 (11.8)	1/9
Follicular carcinoma§	10 (11.8)	0/10
Medullary thyroid cancer	2 (2.4)	0/2
Malignant lymphoma	2 (2.4)	0/2



## RESULTADOS

---

- O VPN para atipia ou lesão folicular de significado indeterminado foi de 95% (Beth III)
- O VPN para neoplasia folicular ou lesão suspeita de neoplasia folicular 94% (Beth IV)
- O VPN para achados citológicos sugestivos de malignidade 85% (Beth V)



## RESULTADOS

---

- Dos 85 nódulos malignos ao Hx o classificador definiu como suspeitos 78
  - Dos 7 que não foram detectados(falso negativos)
    - 6 apresentaram escassas células foliculares, sugerindo uma amostragem insuficiente



## RESULTADOS

**Table 3.** Cytologic Findings and Histopathological Diagnosis in Seven Patients with False Negative Results on Gene-Expression Classification.\*

Patient No.	Sex	Nodule Size		Cytologic Diagnosis	Pathological Diagnosis		Final Histologic Diagnosis†	RNA	RNA Integrity Number
		On Ultrasonographic Imaging	On Pathological Examination		Expert 1	Expert 2			
		<i>cm</i>						<i>ng/μl</i>	
1	Female	2.9	3.5	FN-SFN	HCC	FC	Malignant HCC	8.6	7.7
2	Female	2.2	1.0	SUSP	PTC, follicular variant	PTC	Malignant PTC, follicular variant	31.1	7.6
3	Female	3.2	3.0	FN-SFN	PTC, follicular variant	PTC, follicular variant	Malignant PTC, follicular variant	7.6	7.4
4	Male	1.1	1.2	AUS-FLUS	PTC	PTC	Malignant PTC	6.5	7.2
5	Male	1.3	1.2	AUS-FLUS	PTC	PTC	Malignant PTC	38.2	7.4
6	Female	1.1	0.6	AUS-FLUS	PTC	PTC	Malignant PTC	18.1	6.9
7	Female	1.1	0.6	SUSP	PTC	PTC	Malignant PTC	2.0	6.8

\* AUS-FLUS denotes atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance, FC follicular carcinoma, FN-SFN follicular neoplasm or lesion suspicious for follicular neoplasm, HCC Hürthle-cell carcinoma, PTC papillary thyroid carcinoma, and SUSP suspicious for malignancy.

† The final histologic diagnosis was the reference standard.

## DISCUSSÃO

---

- Com o uso do classificador o VPN para citologias com: Bethesda III = 95% e Bethesda IV = 94%
  - Implicando que nódulos Beth III e IV, mas benignos ao classificador gênico tem uma probabilidade de malignidade semelhante aos nódulos bethesda II à PAAF/citologia



## DISCUSSÃO

- Com o uso do classificador o VPN para citologias com: Bethesda V=85%
  - A determinação de um risco de câncer em 15% pode ser útil para se decidir entre uma lobectomia ou uma tireoidectomia total

## DISCUSSÃO

---

- A sensibilidade de 100% para lesões citologicamente benignas e malignas fornece forte evidência independente do desempenho do classificador
- Entretanto a especificidade de 70% para lesões citologicamente benignas adverte que este teste não deve ser usado na análise de amostras com citologia de características benignas
- Juntos estes dados sugerem que o classificador pode ser útil na indicação de conduta expectante nos casos de nódulos PAAF indeterminados e benignos ao classificador

## DISCUSSÃO

---

- O câncer bem diferenciado de tireóide tem um excelente prognóstico, para isso um adequado manejo cirúrgico é necessário
- Atualmente a cirurgia tem finalidades diagnósticas e terapêuticas nas lesões com PAAF indeterminadas
- Trabalhos confirmam a grande eficácia do tratamento cirúrgico no câncer bem diferenciado de tireóide, mas também revelam uma morbidade a longo prazo de 2-10% nesses procedimentos
- Justificando a cirurgia como melhor procedimento apenas quando o fim terapêutico é o alvo



## DISCUSSÃO

---

- A implementação rotineira do classificador gênico poderia levar a uma redução nos gastos (menor número de cirurgias diagnósticas) e a uma melhora modesta na qualidade de vida dos pacientes (redução da exposição de pacientes com lesões benignas às morbidades cirúrgicas)

## DISCUSSÃO

---

- Um ponto forte neste trabalho é a inclusão de uma grande amostragem de pacientes de várias regiões com características demográficas distintas
- Com mais de 4.000 amostras colhidas e analisadas o classificador foi validado para mais de 12 subtipos de lesões malignas e benignas

## DISCUSSÃO

---

- Apesar dos pontos fortes desse estudo, existem alguns limites práticos para que o teste atinja a perfeição
  - Mesmo a análise histopatológica sendo feita por “*experts*” houve discordância em 14% dos casos analisados individualmente, o que se reduziu para 2% após análise conjunta



## DISCUSSÃO

---

- Em 5 de 6 resultados falso negativos para carcinoma papilífero de tireóide (CPT) ocorreu falha do classificador em mostrar assinaturas moleculares independentes do CPT
  - Os aspirados para análise se mostraram paucicelulares indicando que a técnica da PAAF e a heterogenidade do nódulo passam contribuir para resultados com baixa acurácia

## DISCUSSÃO

---

- A prevalência de câncer neste estudo de 32% (85/265) em citologias indeterminadas, mostrou-se superior à previamente reportada na prática clínica (24%), o que afeta a estimativa do VPN
- Caso o valor adotado de prevalência pare este estudo fosse de 24% o VPN global do presente estudo subiria para 95%

## CONCLUSÃO

---

- O estudo mostra que o classificador gênico pode ser usado para identificar uma subpopulação de pacientes com baixa probabilidade de câncer em uma população de pacientes que seriam submetidos à cirurgia diagnóstica
- Os dados sugerem considerar uma abordagem mais conservadora para a maioria dos pacientes com nódulos de citologia indeterminada e benignos de acordo com o classificador de expressão gênica